

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/JP99/05548

01.12.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 20 DEC 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年10月12日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第289785号

出 願 人
Applicant(s):

住友製薬株式会社

09/807223

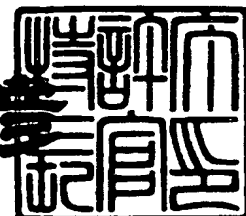
09/807223

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月12日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3078415

【書類名】 特許願

【整理番号】 SP-10-003

【提出日】 平成10年10月12日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 5/10
C12N 7/00
A61K 48/00

【発明の名称】 リコンビナーゼ発現細胞

【請求項の数】 15

【発明者】
【住所又は居所】 東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号
【氏名】 斎藤 泉

【発明者】
【住所又は居所】 東京都品川区西五反田8丁目10番14-1405号
【氏名】 鐘ヶ江 裕美

【特許出願人】
【識別番号】 000183370
【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】
【識別番号】 100095832
【弁理士】
【氏名又は名称】 細田 芳徳

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 050739
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

特平 10-289785

【包括委任状番号】 9200192

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 リコンビナーゼ発現細胞

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 リコンビナーゼ F L P の存在下で F L P 依存的にリコンビナーゼ C r e を発現する細胞。

【請求項 2】 アデノウイルス E 1 A 遺伝子を発現する請求項 1 記載の細胞。

【請求項 3】 ヒト胎児腎細胞株 2 9 3 細胞由来である請求項 1 または 2 記載の細胞。

【請求項 4】 プロモーター、リコンビナーゼ F L P の認識配列、スタッファー配列、リコンビナーゼ F L P の認識配列、リコンビナーゼ C r e 遺伝子配列を上流からこの順にゲノム中に有する請求項 1 ～ 3 いずれか記載の細胞。

【請求項 5】 プロモーターが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニトリ β - アクチンプロモーター、ウサギ β グロビンのスプライシングアクセプターおよびポリ A 配列からなるハイブリッドプロモーター (C A G プロモーター) である請求項 4 記載の細胞。

【請求項 6】 スタッファー配列が、その下流に位置する C r e 遺伝子の発現を抑制するように機能する塩基配列を含有してなる請求項 4 または 5 記載の細胞。

【請求項 7】 C r e 遺伝子の発現を抑制するように機能する塩基配列として、ポリ A 配列、または所望の蛋白質をコードする塩基配列とポリ A 配列を含有してなる請求項 6 記載の細胞。

【請求項 8】 所望の蛋白質が薬剤耐性遺伝子産物である請求項 7 記載の細胞。

【請求項 9】 薬剤耐性遺伝子がネオマイシン耐性遺伝子である請求項 8 記載の細胞。

【請求項 10】 リコンビナーゼ C r e 遺伝子の 5' 側または 3' 側の末端に核移行シグナル配列を有する請求項 4 ～ 9 いずれか記載の細胞。

【請求項 11】 請求項 4 ～ 10 いずれか記載の細胞に、リコンビナーゼ F

LPを導入することによりリコンビナーゼCreを発現させる方法。

【請求項12】 リコンビナーゼFLPを導入する方法が、アデノウイルスベクターを用いることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】 リコンビナーゼFLPの存在下でFLP依存的にリコンビナーゼCreを発現する細胞を用いることを特徴とする、組換えウイルスベクターの製造方法。

【請求項14】 請求項11または12記載の方法および請求項13記載の方法を用いた組換えアデノウイルスベクターの製造方法。

【請求項15】 アデノウイルスベクターが、リコンビナーゼCreの認識配列、アデノウイルスパッケージング配列およびリコンビナーゼCreの認識配列を上流からアデノウイルスゲノム中に順に有することを特徴とする請求項14記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、リコンビナーゼ発現細胞およびかかる細胞を用いる組換えウイルスベクターの作製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

動物細胞への遺伝子導入用または遺伝子治療用のウイルスベクターとして、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス等が用いられている。これらのウイルスベクターを遺伝子治療に用いる場合、その安全性の観点から、ウイルスにコードされる蛋白質がなるべく発現しない構造のベクターが望まれている。

【0003】

レトロウイルスベクターにおいては、ウイルスの増殖に必要なすべての蛋白質を供給するウイルス産生細胞が樹立されている。一方、アデノウイルスベクターやヘルペスウイルスベクターでは、ウイルスにコードされる蛋白質の種類の多さおよびその蛋白質の細胞毒性の問題から、ウイルスの複製に必要なすべての蛋白

質を供給するウイルス産生細胞は樹立されていない。その代替法として、これらのウイルスベクター作製においては、ヘルパーウイルスを使用する方法が用いられている。その方法は、目的の遺伝子を挿入したベクター側のウイルスは、ウイルスの増殖に必須の遺伝子の一部またはすべてを除いてあるため、ベクター単独では増殖できないが、ヘルパーウイルスからウイルスの増殖に必要なウイルス蛋白質を供給することにより、ヘルパーウイルスとともにベクターも増殖させるというものである。このヘルパーウイルスを用いる方法により、アデノウイルスベクター(Mitani et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.92. 3854-3858 (1995))やヘルペスウイルスベクター(Banerjee et. al., Nature Medicine. Vol.1, 1303-1308 (1995))が作製されている。

【0004】

ヘルパーウイルスを用いるウイルスベクター作製法での課題の一つは、目的ウイルスベクターに対してヘルパーウイルスの量をいかに減らすかという点である。そのため、アデノウイルスベクターでは、パッケージング配列の変異株由来のヘルパーウイルスを用いてヘルパーウイルスDNAのウイルス粒子(virion)へのパッケージング効率を下げ、ヘルパーウイルスの増殖速度を遅くした工夫や(Kochanek et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93. 5731-5736 (1996))、ヘルパーウイルスのパッケージング配列の両側にリコンビナーゼCreの認識配列である10xP配列を挿入し、このヘルパーウイルスをリコンビナーゼCreを発現する細胞に感染させることによりパッケージング配列を除く工夫(Parks et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93. 13565-13570 (1996))等がなされている。

【0005】

特に、後者の方法において、リコンビナーゼCreを発現する細胞は重要であり、Creを恒常的に発現するいくつかの細胞株が報告されている(Parks et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 93. 13565-13570 (1996)、Chen et. al., Somat. Cell Mol. Genet. Vol. 22. 477-488 (1996)、Lieber et. al., J. Virol. Vol.70. 8944-8960 (1996))。しかし、リコンビナーゼCreは、動物細胞に対して細胞毒性を有するため、恒常的にCreを発現する細胞株は樹立できるものの、高発現プロモーターの制御下にCreを大量に発現する安定な細胞株は樹

立しにくいと考えられている(Lieber et. al. J. Virol. Vol.70. 8944-8960 (1996))。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、種々のウイルスベクターの作製のために用いる、Creを高発現する細胞を提供することにある。本発明のさらなる目的は、かかる細胞を使用して、より効率的な組換えウイルスベクターの作製方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

Cre蛋白質に限らず、細胞毒性を有する蛋白質を恒常的に発現する細胞株を樹立しようとする場合、一般に高発現プロモーター下流に当該蛋白質遺伝子を組み込んだプラスミド等で細胞を形質転換しても、当該蛋白質を高レベルで安定に発現する細胞株は得にくく、当該蛋白質の毒性が細胞にとって許容レベル以下の量の蛋白質を発現する細胞株しか得られないことが多い。

【0008】

一方、薬剤等により蛋白質の発現を誘導するプロモーターも知られている。しかし、一般にこのような誘導型のプロモーターは、恒常的に発現する強力なプロモーターに較べれば、そのプロモーター活性は弱いことが知られている。

【0009】

そこで、本発明者らは、強力なプロモーターからCre蛋白質を発現する安定な細胞株を得るための手段として、プロモーターとCre遺伝子との間にリコンビナーゼFLPの認識配列およびスタッファーDNAを挿入することにより、Cre蛋白質の発現を制御することに成功した。この細胞株は、リコンビナーゼFLPが存在しない場合にはCre蛋白質がほとんど発現しないため、Creの細胞毒性が回避でき、FLP存在下では強力なプロモーターからCre蛋白質が高発現する。

【0010】

すなわち、本発明の要旨は、

- (1) リコンビナーゼ FLP の存在下で FLP 依存的に リコンビナーゼ Cre を発現する細胞、
- (2) 前記 (1) 記載の細胞に、リコンビナーゼ FLP を導入することにより リコンビナーゼ Cre を発現させる方法、
- (3) リコンビナーゼ FLP の存在下で FLP 依存的に リコンビナーゼ Cre を発現する細胞を用いることを特徴とする、組換えウイルスベクターの製造方法、ならびに
- (4) 前記 (2) および前記 (3) 記載の方法を用いた組換えアデノウイルスベクターの製造方法、に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明において、「リコンビナーゼ FLP」とは、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の 2 ミクロン DNA によりコードされ、2 つの FLP の認識配列 (FRT) 間の部位特異的組換え反応を行なう酵素である (Babineau et. al.; J. Biol. Chem., Vol. 260, 12313-12319 (1985))。FLP は、2 つの同一方向の FRT に挟まれた DNA を切り出すことが可能である。FRT は 34 bp からなる塩基配列 (Jayaram et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 82, 5875-5879 (1985)) であり、本発明においては、「FLP の認識配列」とは、FRT を含む塩基配列であれば特に限定されない。

【0012】

本発明において、「リコンビナーゼ FLP の存在下で FLP 依存的に リコンビナーゼ Cre を発現する」とは、リコンビナーゼ FLP の非存在下では FLP 依存的に リコンビナーゼ Cre が発現できないように構築された DNA をゲノム中に有する細胞が、リコンビナーゼ FLP の存在下では、2 つの同一方向の FRT に挟まれた DNA を切り出すことにより、リコンビナーゼ Cre の発現を開始することをいう。

【0013】

本発明において「リコンビナーゼ Cre」とは、大腸菌のバクテリオファージ

P1がコードし、バクテリオファージP1内のloxP配列 (Abremskiら、J. Biol. Chem. 1509-1514 (1984) ; および Hoessら、Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 81, 1026-1029 (1984))を基質とする、特異的なDNA組換え酵素であり、loxP配列を認識し、この配列間でDNAの切断、鎖の交換と結合の全工程を行なう。即ち、loxP配列がリコンビナーゼCreの認識配列となる。

【0014】

リコンビナーゼCre遺伝子は、バクテリオファージP1のDNAのリコンビナーゼ遺伝子をコードする部分を、例えば、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 法を用いて増幅してプラスミドにクローニングしたもの (例えば、pUCCre (特開平8-84589号公報)) から適当な制限酵素により切り出して使用することができる。

【0015】

本発明においては、リコンビナーゼCre遺伝子配列の5'側または3'側の末端に核移行シグナル配列を接続させていることが好ましい。これは、細胞質で合成されたリコンビナーゼCreがその認識配列であるloxP配列を有するDNAに効果的に作用するには、核内に移行する必要がある、核移行シグナル配列はこれを促進する (Daniel Kalderon ら、Cell. 39, 499-509 (1984)) からである。核移行シグナル配列を有するCre遺伝子は、プラスミドpSRNCre (Kanegae Y. et. al., Nucleic Acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995)) 等から得ることができる。

【0016】

本発明の細胞のゲノムに存在する前記構築DNAは、具体的には、プロモーター、リコンビナーゼFLPの認識配列、スタッパー配列、リコンビナーゼFLPの認識配列、リコンビナーゼCre遺伝子配列を上流からこの順に含む。

【0017】

前記プロモーターとしては、哺乳動物細胞で機能する限り特に限定されないが、その例として、SR α プロモーター (Molecular and Cellular Biology, Vol.8, 466-472 (1991))、EF-1 α プロモーター (Gene, Vol.91, 217-223 (1990))、CMVプロモーター等が挙げられる。

【0018】

しかし本発明には、CAGプロモーターが特に有利に用いられる。このプロモーターは、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチンプロモーター、ウサギβグロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター（CAGプロモーター）であり、高発現ベクターとして特開平3-168087号公報に開示されている。その調製は同公報に記載されているpCAGGS（特開平3-168087号公報、13頁20行～20頁14行および22頁1行～25頁6行）から制限酵素SalI、HindIIIで切り出すことにより行なうことができ、本発明に利用することができる。また、市販のプラスミドから適当な制限酵素で切り出して用いることもできる。

【0019】

リコンビナーゼFLPの認識配列とは、前記したように、FRTを含む塩基配列であれば特に限定されない。当該配列は、DNA合成装置により合成して用いることができる。

【0020】

前記スタッパー配列とは、2つの同一方向のリコンビナーゼFLPの認識配列に挟まれた塩基配列をいい、FLPの存在下では環状に切り出される配列である。

【0021】

スタッパー配列は、Cre遺伝子の発現を阻止する配列であれば特に制限はないが、細胞をトランスフェクションして目的のDNAが組み込まれたかどうかを確認することができるように、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を含有することが好ましく、哺乳動物細胞の選択に好適に用いられるネオマイシン耐性遺伝子がより好ましい。また、スタッパー配列は、薬剤耐性遺伝子を効率的に発現させ、下流に位置するリコンビナーゼCre遺伝子が発現しないように、薬剤耐性遺伝子の下流にポリA配列をも含むことがさらに好ましい。ポリA配列としては、特に限定されるものではないが、SV40由来のポリA配列、ウサギβグロビンのポリA配列等が挙げられる。これらの薬剤耐性遺伝子およびポリA配列は、市販のプラスミドから入手可能である。

【0022】

リコンビナーゼCre遺伝子の下流に用いられるポリA配列としては、特に限定されるものでないが、ウサギβグロビン由来のものが好ましい。

【0023】

本発明の細胞を調製するために用いる細胞としては、目的のウイルスベクターの増殖に適した細胞であれば特に限定されない。

【0024】

本発明の細胞をアデノウイルスベクター作製に用いる場合は、アデノウイルスE1A遺伝子を発現する細胞を用いることが望ましい。E1A遺伝子を発現する細胞は、既存の方法(Imler et. al. Gene Ther. Vol. 3. 75-84 (1996))等により作製できるが、E1A遺伝子を持続的に発現しているヒト胎児腎由来細胞株293細胞(ATCC CRL1573)がより好ましい。しかしながら、当該細胞がE1A遺伝子のみを発現している必要はなく、他のアデノウイルス遺伝子やその他の遺伝子が発現していてもよい。

【0025】

以下、293細胞を用いて、リコンビナーゼFLPの存在下でFLP依存的にリコンビナーゼCreを発現する細胞の調製方法の一例を説明する。

【0026】

〔1〕 34bpのFRT配列を含有し、制限酵素SwaI部位を導入するために合成された54bpのDNA(配列番号:1)を同じ方向に2個含み、かつ、2個のFRT配列間にSwaI部位を有するプラスミドを構築する。以下、本発明においては、SwaI部位を導入したプラスミド等が好適に用いられる。

【0027】

〔2〕 プラスミドpCALNLZ(Y. Kanegae et. al., Gene, Vol.181, 207-212 (1996)、図1A))からネオマイシン耐性遺伝子とSV40のポリA配列を含む断片を調製し、前記〔1〕で得られたプラスミドのSwaI部位に挿入して、当該断片の両端にFRT配列を有するプラスミドpUFNF(図1B)を得る。

【0028】

〔3〕 CAGプロモーターおよびウサギ β -グロビンポリA配列の供給源であるプラスミドpCALNLw (Kanegae Y. et. al., Gene, Vol.181, 207-212 (1996))のSwa I部位に27塩基の合成ポリリンカー(配列番号:2)を挿入し、プラスミドpCALNL5(図1C)を得る。前記〔2〕で得られたpUFNFからFRT配列/ネオマイシン耐性遺伝子/SV40のポリA配列/FRT配列を含む断片を調製し、前記pCALNL5由来のCAGプロモーターを含む断片と連結し、プラスミドpCAFNF5を得る。このプラスミドは、pCALNL5の2つのloxP配列それぞれがFRT配列に置換された構造を有する。

【0029】

〔4〕 プラスミドpSRNCre (Kanegae Y. et. al., Nucleic Acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995))から核移行シグナルを付加したCre遺伝子(NCre)を含む断片を調製し、前記〔3〕で得られたpCAFNF5のSwa I部位に挿入し、プラスミドpCAFNFNCre(図2)を得る。

【0030】

〔5〕 293細胞に前記〔4〕で得られたpCAFNFNCreをトランスフェクション(リン酸カルシウム共沈法)後、G418(ネオマイシン誘導体)耐性細胞をシングルクローン化し、本発明の細胞(293FNCre細胞)を得る。

【0031】

このようにして得られた293FNCre細胞等の本発明の細胞は、当該細胞にリコンビナーゼFLP遺伝子またはFLP蛋白質を導入することにより、リコンビナーゼCreを高発現することができる。リコンビナーゼFLP遺伝子の導入方法としては、プラスミドを直接またはトランスフェクションにより導入する方法、ウイルスベクターを用いる方法、リボソーム法などが挙げられる。293FNCre細胞等のアデノウイルスの増殖に適した細胞の場合は、FLP遺伝子はアデノウイルスベクターを用いて導入するのがより好ましい。

【0032】

293FNCre細胞等の本発明の細胞は、ヘルパーウイルスを用いるウイルスベクターの作製に利用できる。293FNCre細胞を用いた組換えアデノウ

イルスベクターの作製を例として、以下にその具体的な方法を示す。

【0033】

アデノウイルスの逆方向反復配列 (inverted terminal repeat: ITR) とパッケージング配列のみを有し、他のすべてのアデノウイルスゲノムが外来遺伝子に置換された組換えアデノウイルスベクター (目的ウイルス) は、それ単独では増殖することができないため、ヘルパーウイルスの共存下に増殖させる。その際、ヘルパーウイルスの増殖を抑制するため、ヘルパーウイルスのパッケージング配列の両端に $1 \times P$ 配列を挿入しておき、このヘルパーウイルスと目的ウイルスまたは目的ウイルスの DNA を含むプラスミドとを Cre 発現 293 細胞に感染またはトランスフェクションすることにより、ヘルパーウイルスのパッケージング配列を欠失させ、その増殖を抑制し、目的ウイルスの割合を高める試みがなされている (Parks et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 13565-13570 (1996))。この場合、Cre の発現量が高いほど効率的にヘルパーウイルスのパッケージング配列が除かれ、目的ウイルスの割合が高くなると考えられる。

【0034】

本発明の 293 FNCre 細胞は、FLP 発現組換えアデノウイルスと共に用いることにより、Cre 発現 293 細胞を代替でき、恒常的に Cre を発現する 293 細胞よりも大量の Cre を発現することができる。したがって、Cre 発現 293 細胞よりも効率的にヘルパーウイルスのパッケージング配列を除くことができ、目的ウイルスの割合を高めることができる。その際、FLP 発現アデノウイルス自体のパッケージング配列の両端に $1 \times P$ 配列を挿入しておけば、このアデノウイルスは FLP を供給するだけでなく、ヘルパーウイルスとして作用させることができる。

【0035】

本発明の 293 FNCre 細胞等の細胞は、組換えアデノウイルスベクター作製だけでなく、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの作製にも用いることができる。以下に 293 FNCre 細胞を用いた AAV ベクター作製の例を挙げる。

【0036】

AAVベクターの作製には、AAVのベクタープラスミドと共に、ヘルパーウイルスとしてアデノウイルスを293細胞等の細胞に感染させる必要がある(Berns et. al., Adv. Virus. Res., Vol. 32, 243-306 (1987))。ヘルパーウイルスとして用いたアデノウイルスは、AAVベクター生成後に、熱失活等の操作によりAAVベクターから除く必要があるため、ヘルパーウイルス自体は増殖しない方が望ましい。

【0037】

本発明の293FNCr e細胞をAAV産生細胞として、パッケージング配列の両端に10xP配列を挿入したFLP発現アデノウイルスをヘルパーウイルスとして用いることにより、ヘルパーウイルスはAAVの増殖に必要な蛋白質を供給するがそれ自体は感染粒子にパッケージングされないため、効率的にAAVベクターを製造することができる。

【0038】

さらに、本発明の細胞は、ヘルパーウイルスを用いる他のウイルスベクター作製にも応用できる。その例として、ヘルペスウイルスベクターが挙げられる。ヘルペスウイルスの増殖に適した細胞を、293FNCr e細胞と同様な方法で形質転換し、FLP依存的にCr eを発現するようにしておく一方、ヘルパーウイルスは、パッケージング配列の両端に10xP配列を挿入しておく。目的遺伝子を有するベクタープラスミドをFLP依存的にCr eを発現する細胞にトランスフェクションし、ヘルパーウイルスを感染させ、何らかの方法で細胞にFLPを発現させることにより、ヘルパーウイルスはパッケージング配列が除かれるため増殖せず、目的のベクターウイルスのみが得られる。細胞にFLP蛋白質を発現させる例として、ヘルパーウイルスにFLPの発現単位を挿入しておく方法が挙げられる。

【0039】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。なお、実施例中のファージ、プラスミド、DN

A、各種酵素、大腸菌、培養細胞等を取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis ら編、第2版 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行なった。

【0040】

本実施例で用いたコスミドベクター pAxCawt (Kanegae Y. et. al., Nucleic acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995)) および pAxcw (特開平 8-308585 号公報、15 頁、pAdexlcw は pAxcw と同一である) は、アデノウイルス E1 および E3 遺伝子以外のアデノウイルス 5 型ゲノムの大部分を含むベクターである。また、pAxCawt は、E1 遺伝子欠失部位に CAG プロモーターが導入され、かつプロモーターとポリ A 配列との間にクローニング部位が存在する。pAxCawt は、E1 遺伝子欠失部位に ClaI および SwaI 部位のみが挿入されている。

【0041】

実施例 1

FLP 蛋白質依存的にリコンビナーゼ Cre を発現する細胞株 (293 FNCr e 細胞) の作製

動物細胞の染色体上に、CAG プロモーター/FRT 配列/ネオマイシン耐性遺伝子/SV40 ポリ A 配列/FRT 配列/核移行シグナル付き Cre 遺伝子/β-グロビンポリ A 配列の構造を有する DNA が挿入された細胞株を得るために、以下の操作を行なった。

【0042】

34bp の FRT 配列を含む 54 塩基の合成 DNA (配列番号: 1) およびその相補鎖をプラスミド pUC18 の SmaI 部位に挿入し、FRT 配列が同方向に 2 個挿入され、かつ 2 個の FRT 配列間に SwaI 部位を有するプラスミド pUFwF (2.8kb) を得た。

【0043】

プラスミド pCALNLZ (Y. Kanegae et. al., Gene, Vol.181, 207-212 (1996)、図 1A)) を MluI および XhoI で消化後平滑化したネオマイシン耐性遺伝子と SV40 のポリ A 配列を含む断片を、pUFwF の SwaI 部位に

挿入したプラスミド pUFNF (図 1B) を得た。

【0044】

プラスミド pCALNLw (Kanegae Y. et. al., Gene, Vol.181, 207-212 (1996)) の Swa I 部位に 27 塩基の合成ポリリンカー (5'-AAA TTG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG-3'、配列番号: 2) およびその相補鎖を挿入し、プラスミド pCALNL5 (図 1C) を得た。pUFNF を BamHI および Asp718 で消化し平滑化した FRT 配列/ネオマイシン耐性遺伝子/SV40 のポリ A 配列/FRT 配列を含む約 1.2 kb の断片を、pCALNL5 を MluI および XhoI で消化後平滑化した CAG プロモーターを含む約 4.9 kb の断片と連結し、プラスミド pCAFNF5 (6.1 kb) を得た。

【0045】

プラスミド pSRNCr (Kanegae Y. et. al., Nucleic Acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995)) を PstI および XbaI で消化後平滑化した核移行シグナルを付加した Cr 遺伝子 (NCr) を含む 1.2 kb の断片を、pCAFNF5 の Swa I 部位に挿入し、プラスミド pCAFNFNCr (図 2) を得た。

【0046】

293 細胞を pCAFNFNCr で形質転換 (リン酸カルシウム共沈法) 後、G418 (ネオマイシン誘導体) 耐性細胞をシングルクローン化し、複数の細胞株 (293FNCr 細胞) を得た。

【0047】

実施例 2

リコンビナーゼ FLP 発現プラスミドおよび組換えアデノウイルスの作製

リコンビナーゼ FLP の翻訳開始コドンの前後の塩基配列を Kozak 配列に合わせたプラスミドを得るため、以下の操作を行った。

【0048】

(a) プラスミド pUCFLP は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の 2 ミクロン DNA (6318 bp: James et al., Nature, Vol. 286, 860-865 (1980)) の SphI 部位 (5568 番目) から XbaI 部位 (703 番目) までの FLP 遺

伝子全長を含む断片(1457bp)が、プラスミドpUC19のSphI-XbaI部位間に挿入されたプラスミドである。pUCFLPをXbaIおよびSphIで消化し、FLP遺伝子全長を含む約1.5kbの断片を得た。

【0049】

(b) 5'末端突出側がHindIII切断部位と、もう一方の末端がSphI切断部位と結合可能で、かつ翻訳開始コドンの上流にPstI部位を有する以下の配列の合成DNAアダプターを調製した。

5'-AG CTT CTG CAG CAG ACC GTG CAT CAT G-3' (配列番号: 3)

3'-A GAC GTC GTC TGG CAC GTA-5' (配列番号: 4)

【0050】

(a) および (b) の両DNAをpUC19のHindIII-XbaI部位間に挿入し、プラスミドpUKFLP(4.1kb)を得た。

【0051】

pUKFLPをPstIおよびFspIで消化後平滑化したFLPコード領域を含む1.4kbの断片を、コスミドベクターpAxCawtのプロモーターとポリA配列との間のSwaI部位に挿入し、コスミドベクターpAxC AFLPを得た。

【0052】

前記pAxC AFLPをSalI消化後、自己ライゲーションさせ、アデノウイルスDNAの大部分を除いた(左端約0.4kbを含む)FLP発現プラスミドpAxC AFLP(図3A)を得た。また同様に、pAxCawtをSalI消化後自己ライゲーションさせたプラスミドpAxCawt(図3B)も作製した。pAxCawtは、実施例3においてpAxC AFLPの陰性対照プラスミドとして用いる。

【0053】

pAxC AFLPとアデノウイルスDNA-末端蛋白質複合体とを既知の方法(Miyake et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 1320-1324 (1996)および特開平7-298877号公報)に従いリン酸カルシウム共沈法で293細胞を形質転換し、目的のFLP発現組換えアデノウイルスAxC AFLP(E1および

E3遺伝子欠失)を得た。

【0054】

実施例3

293FNCr e細胞のFLP蛋白質に依存したCr e蛋白質の発現確認

(1) Cr e蛋白質に依存してlacZ遺伝子を発現するプラスミドの作製
コスミドベクターpAxCALNLZ (Kanegae et. al., Nucleic Acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995))は、コスミドベクターpAxcwのE1遺伝子欠失部位に、CAGプロモーター/loxP配列/ネオマイシン耐性遺伝子/SV40ポリA配列/loxP配列/大腸菌lacZ遺伝子/β-グロビンのポリA配列が挿入されたコスミドである。pAxCALNLZをSalI消化後自己ライゲーションさせ、アデノウイルスDNAの大部分を除いた(左端約0.4kbを含む)プラスミドpxCALNLZ(図3C)を作製した。pxCALNLZは、Cr e蛋白質に依存してlacZ遺伝子を発現するベクターである。

【0055】

(2) 293FNCr e細胞のFLP蛋白質に依存したCr e蛋白質の発現
293FNCr e細胞がFLP蛋白質依存的にCr e蛋白質を発現することの確認は、実施例2で作製したプラスミドpxCAFLPとプラスミドpxCALNLZとのコ・トランスフェクション法により行なった。その原理は、pxCAFLPにより発現したFLP蛋白質が293FNCr e細胞の染色体に作用し、2個のFRT配列間のスタッファー配列(ネオマイシン耐性遺伝子およびSV40ポリA配列)を切り出し、CAGプロモーターからCr e蛋白質が発現する。

発現したCr e蛋白質が、プラスミドpxCALNLZの2個のloxP配列間のスタッファー配列(ネオマイシン耐性遺伝子およびSV40ポリA配列)を切り出すことにより、lacZ遺伝子が発現する。したがって、これらの2つのプラスミドをコ・トランスフェクションした細胞がlacZ遺伝子を発現すれば、293FNCr e細胞がFLP蛋白質依存的にCr e蛋白質を発現することの証明となる。以下に、実験方法の詳細および結果を示す。

【0056】

実施例1で得た293FNCr e細胞のクローンのうちの6クローン(#1、

#2、#3、#6、#8および#9)を6穴プレートで培養し、 $0.5\mu\text{g}$ のp_xCAFLPと $0.5\mu\text{g}$ のp_xCALNLZとをリン酸カルシウム共沈法にてコ・トランスフェクションした。陰性対照として、p_xCAFLPの代わりに実施例2で作製したp_xCAwtを用いた。

【0057】

3日後、培養液を除き、PBS(−)で細胞面を洗浄後、0.25%グルタルアルデヒド液を加え、4℃で10分間細胞を固定後、再度PBS(−)で洗浄した。発現したβ-ガラクトシダーゼを同定するため、X-Gal染色液(5mMフェリシアン化カリウム/5mMフェロシアン化カリウム/2mM塩化マグネシウム/1mg/ml X-Gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド)/PBS(−))を加えて5時間染色した。

【0058】

以上の実験の結果、#1、#3、#6および#9の4クローンは、p_xCAwtとp_xCALNLZとをコ・トランスフェクションした場合は、β-ガラクトシダーゼを発現し、青く染色された細胞は数%以下であったが、p_xCAFLPとp_xCALNLZとをコ・トランスフェクションすると、約50%の細胞が青く染色された。したがって、これらの4クローンは、プロモーターとCre遺伝子との間に、-FRT配列/ネオマイシン耐性遺伝子/SV40ポリA配列/FRT配列-が正確に挿入され、FLP蛋白質依存的にCre蛋白質を高発現することが証明された。

【0059】

配列表フリーテキスト

配列番号：1の塩基配列は、FLPの認識配列である。

【0060】

配列番号：2の塩基配列は、ポリリンカーである。

【0061】

配列番号：3の塩基配列は、アダプターのセンス鎖である。

【0062】

配列番号：4の塩基配列は、アダプターのアンチセンス鎖である。

【0063】

【発明の効果】

本発明により、組換えウイルスベクター、特に、組換えアデノウイルスベクターの製造に有用な細胞が提供される。本発明により、組換えウイルスベクターの製造が効率的に行なわれ、遺伝子治療の分野で利用可能な組換えウイルスベクターの供給が容易になる。

【0064】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Cells Expressing Recombinase

<130> SP-10-003

<160> 4

【0065】

<210> 1

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FLP recognition sequence

<400> 1

aaattccgga gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcgacgtc attt

54

【0066】

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polylinker

<400> 2

aaattgaatt cgagctcggg acccggg

27

【0067】

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense Strand of Adaptor

<400> 3

agcttctgca gcagaccgtg catcatg

27

【0068】

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Strand of Adaptor

<400> 4

atgcacgggc tgctgcaga

19

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、プラスミドpCALNLZ (A)、プラスミドpUFNF (B) およびプラスミドpCALNL5 (C) の構造を示す模式図である。図中、CA P r oはCAGプロモーター、Ne o^Rはネオマイシン耐性遺伝子、Sp AはSV 40ポリA配列、G p Aはβ-グロビンポリA配列を示す。斜線を引いた箱内の部分はlox P配列を、黒塗り部分はFRT配列を示す。Ap^Rはアンピシリン耐性遺伝子、oriはプラスミドの複製起点を示す。Xは制限酵素Xho I部位を、Mは制限酵素Mlu I部位を示す。

【図2】

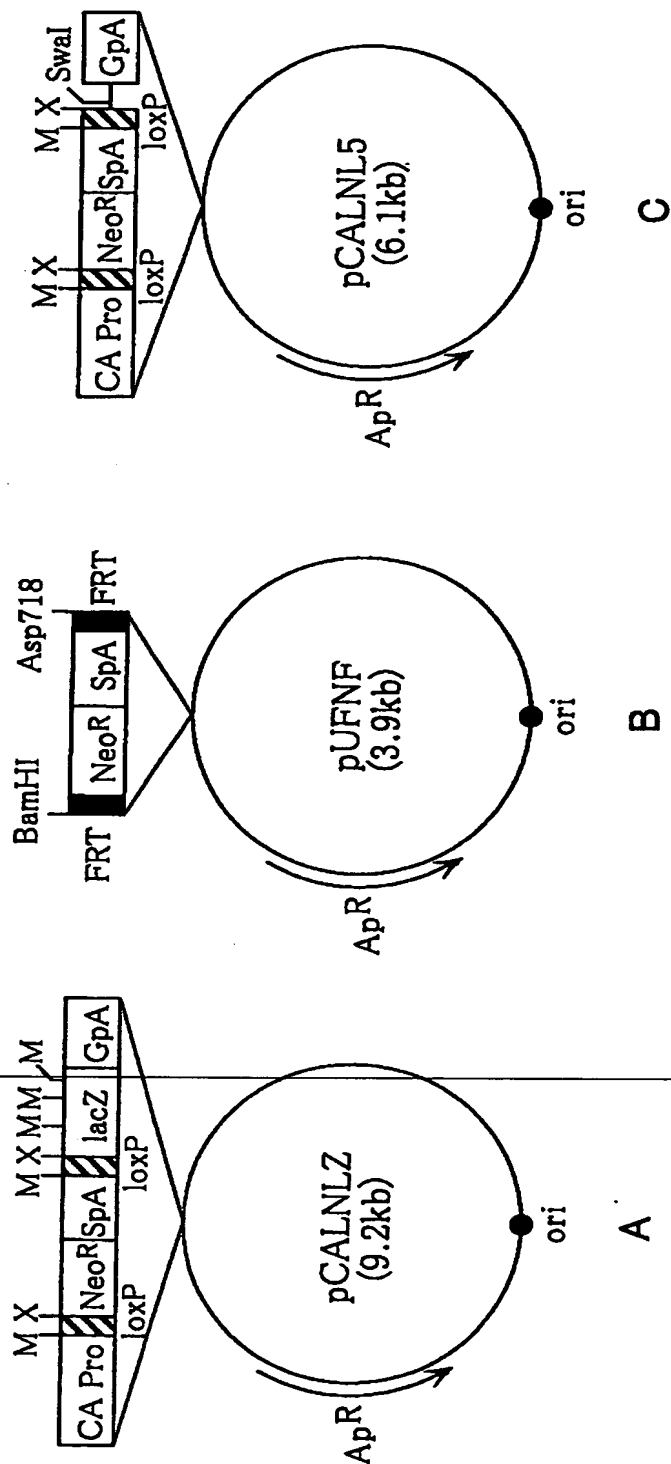
図2は、プラスミドpCAFNFNCr eの構造を示す模式図である。NCr eは核移行シグナルを有するCr e遺伝子を示す。

【図3】

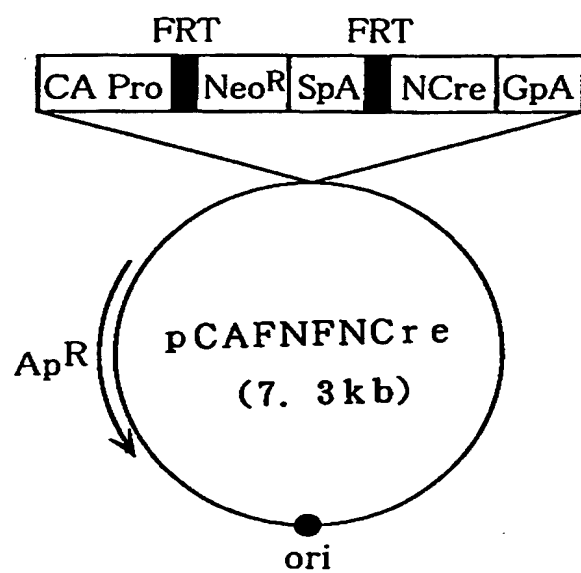
図3は、プラスミドp xCAFLP (A)、プラスミドp xCAwt (B) およびプラスミドp xCALNLZ (C) の構造を示す模式図である。太線部は、アデノウイルスゲノム(約0.4 kb)を示す。

【書類名】 図面

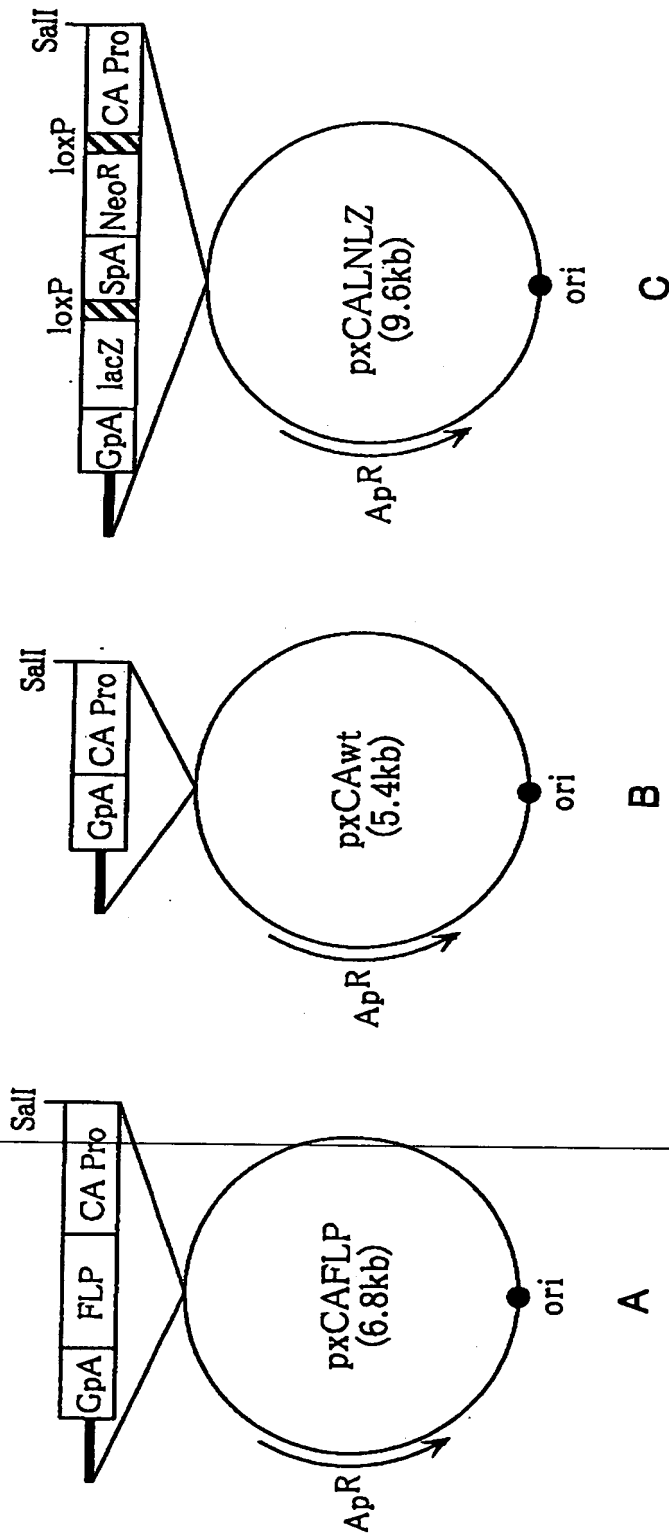
【図1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

種々のウイルスベクターの作製のために用いる Cre を高発現する細胞およびかかる細胞を使用してより効率的な組換えウイルスベクターの作製方法を提供すること。

【解決手段】

リコンビナーゼ FLP の存在下で FLP 依存的にリコンビナーゼ Cre を発現する細胞、前記細胞にリコンビナーゼ FLP を導入することによりリコンビナーゼ Cre を発現させる方法、リコンビナーゼ FLP の存在下で FLP 依存的にリコンビナーゼ Cre を発現する細胞を用いることを特徴とする、組換えウイルスベクターの製造方法、ならびに前記 Cre を発現させる方法および前記組換えウイルスベクターの製造方法を用いた組換えアデノウイルスベクターの製造方法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100095832

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区谷町2丁目8番1号 大手前M
2ビル5階 細田国際特許事務所

【氏名又は名称】 細田 芳徳

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000183370]

1. 変更年月日

1990年 8月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名

住友製薬株式会社